

TRABALLO DE FIN DE GRAO

Rosa López Pazos



Expresión de miostatina en células de mamífero

Expression of myostatin in mammalian cells

Curso 2015-2016



AGRADECIMIENTOS

Al profesor Matjaž Ravnikar, quien tanto me ayudó durante una inolvidable experiencia de intercambio en Ljubljana.

A mis amigos, por los momentos vividos durante estos años de carrera.

Lo mejor siempre queda para el final, a mi madre, mi padre y mis hermanos, por su paciencia y su apoyo incondicional.

ÍNDICE

1. Resumen/Abstract y palabras clave.....	Pág. 5
2. Abreviaturas	Pág. 7
3. Introducción	Pág. 9
4. Objetivos.....	Pág. 15
5. Desarrollo del trabajo.....	Pág. 17
5. 1 Obtención de DNA recombinante.....	Pág. 19
5. 1. 1 Purificación del plásmido pPIC9/(His) ₆ MSTN.....	Pág. 19
5. 1. 2 Restricción: obtención del vector pcDNA3 y del inserto (His) ₆ MSTN.....	Pág. 20
5. 1. 3 Ligación: obtención del plásmido recombinante pcDNA3/(His) ₆ MSTN.....	Pág. 21
5. 2 Clonación de DNA recombinante.....	Pág. 21
5. 2. 1 Transformación bacteriana	Pág. 21
5. 2. 2 Selección y cultivo de transformantes.....	Pág. 22
5. 2. 3 Purificación de pcDNA3/(His) ₆ MSTN clonado	Pág. 22
5. 3 Expresión de DNA recombinante	Pág. 22
5. 3. 1 Transfección de HEK293.....	Pág. 22
5. 3. 2 Purificación de proteína recombinante: cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados	Pág. 23
5. 3. 3 Análisis de proteína recombinante: electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y transferencia Western	Pág. 26
6. Discusión.....	Pág. 31
7. Conclusiones	Pág. 35
8. Bibliografía	Pág. 37

1. RESUMEN/ABSTRACT

La miostatina es un miembro de la familia del factor de crecimiento transformante beta que se produce principalmente en el músculo esquelético y ejerce una función negativa sobre su desarrollo. La inhibición de la actividad de la miostatina está relacionada con un aumento marcado de la musculatura esquelética. Hoy en día, son muchas las patologías relacionadas con el desgaste muscular y la atrofia en las que se cree que la miostatina podría estar implicada. Esto ha motivado el estudio de potenciales fármacos que inhiban la miostatina o bloqueen sus vías de señalización celular. También existe la posibilidad de su uso ilícito como sustancias estimulantes para potenciar el rendimiento deportivo.

En este estudio se aborda la obtención de miostatina humana empleando como vehículo de expresión una línea celular humana. Además, se realiza una revisión bibliográfica de la utilidad de la miostatina como biomarcador y de la detección de sus inhibidores en controles antidopaje.

Myostatin is a family member of the transforming growth factor beta that is produced mainly in skeletal muscle and plays a negative role on its development. Inhibition of myostatin activity is related with a marked increase in skeletal muscle. Nowadays, myostatin is believed to be involved in many pathologies related with muscle wasting and atrophy. This has motivated the study of potential drugs that inhibit myostatin or its cell signaling pathways. Likewise, there is also the possibility of its misuse as stimulant substances to enhance athletic performance.

In this research obtaining human myostatin using a human cell line as an expression vehicle is addressed. In addition, a literature review of the usefulness of myostatin as a biomarker and detection of its inhibitors in drug testing is performed.

Palabras clave: miostatina, células HEK293, proteína recombinante, biomarcador, dopaje, inhibidores de miostatina.

2. ABREVIATURAS

MSTN: miostatina

GDF-8: factor de diferenciación del crecimiento 8 (*growth differentiation factor 8*)

TFG- β : factor de crecimiento transformante beta (*growth transforming factor β*)

LAP: propéptido de latencia asociado (*latency associated propeptide*)

BMP: proteína morfogénica del hueso (*bone morphogenic protein*)

ActRII: receptor de activina tipo II

PS: péptido señal

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica

SIDA: síndrome de la deficiencia humana adquirida

BYM338: Bimagrumab

GDF-11: factor de diferenciación del crecimiento 11 (*growth differentiation factor 11*)

AMA: agencia mundial antidopaje

PBS: tampón fosfato salino

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

E. coli: *Escherichia coli*

LB: Luria-Bertani

NTA: ácido nitrilotriacético

SDS-PAGE: gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico

APS: persulfato amónico

TEMED: tetrametiletiléndiamina

DTT: ditioneitol

3. INTRODUCCIÓN

Mucho se ha avanzado en el conocimiento de la miostatina desde que fue descrita por primera vez en 1997 por Alexandra McPherron y colaboradores [1]. Al año siguiente, Néstor González-Cadavid y su equipo serían los pioneros en aislarla en humanos [2]. La miostatina (MSTN), también conocida como GDF-8 (del inglés *growth differentiation factor 8*), es un miembro de la superfamilia de proteínas del factor de crecimiento transformante beta (también del inglés *transforming growth factor beta*, TGF- β) [3]. Se expresa mayoritariamente en el músculo esquelético [1] y, en menor medida, en el músculo cardíaco [4], en el tejido adiposo [5] y en el hueso tras una fractura [6], entre otros. Es secretada a la circulación en su forma inactiva (promiostatina) y ejerce sus acciones de forma autocrina, paracrina y endocrina [7]. Al igual que ocurre con otros miembros de la familia del TGF- β , esta miocina (citocina producida en células musculares) [8] es sintetizada en forma de un precursor denominado pre-promiostatina, que se compone de: a) un núcleo N-terminal de aminoácidos hidrofóbicos que constituye una secuencia señal de secreción, b) un propéptido regulador, también denominado LAP (del inglés *latency associated propeptide*) y c) un dominio C-terminal que contiene nueve residuos de cisteína, responsables de la formación del homodímero. En su procesamiento se realizan dos cortes proteolíticos. El primero tiene lugar en el aparato de Golgi de la célula. Una furina separa el propéptido del dominio C-terminal. Este se combina con otro dominio C-terminal mediante puentes disulfuro dando lugar a un homodímero de miostatina, que es la proteína madura. Otras dos moléculas de propéptido se le unen de forma no covalente, dando lugar a un complejo latente inactivo que se secreta. Esta asociación impide que la miostatina se una a un receptor situado en la superficie de la célula diana [7]. La segunda escisión ocurre a nivel de la matriz extracelular. Las metaloproteinasas de la familia BMP-1/TLD son las encargadas de romper el enlace débil entre el propéptido y el homodímero [9] [Figura 1]. Una vez libre, el homodímero de miostatina activo, puede unirse a su receptor de activina tipo II (ActRII). La miostatina tiene mayor afinidad por ActRIIB que por ActRIIA. [3], [7]. Así se desencadena una cascada de señales intracelulares que finaliza con la expresión de genes en el núcleo y la ubiquitinación y posterior degradación de proteínas del músculo [10] [Figura 2].

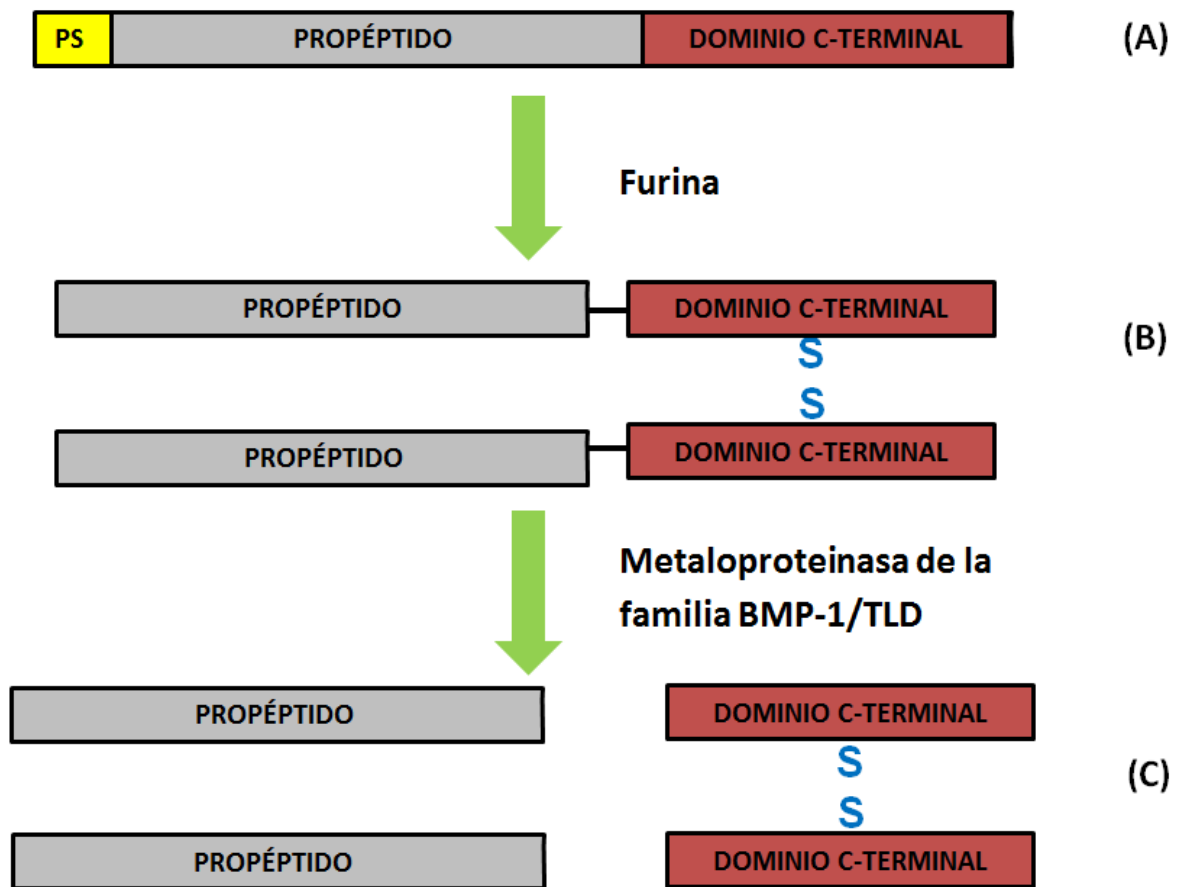


Figura 1: Procesamiento de la miostatina. (A) Precursor de miostatina (pre-promiostatina), compuesto por: péptido señal de secreción (PS) en el extremo amino N-terminal, propéptido o LAP y dominio C-terminal. (B) Promiostatina inactiva que es secretada. El primer procesamiento tiene lugar en el aparato de Golgi por una proteasa furina. El propéptido se separa del dominio C-terminal y dos de estos se combinan en un homodímero tras la formación de un puente disulfuro entre los residuos de cisteína (miostatina madura). Dos moléculas de propéptido permanecen unidas de forma no covalente al homodímero de miostatina, formando un complejo latente inactivo. Se secreta posteriormente. (C) Miostatina madura. En la matriz extracelular tiene lugar el segundo procesamiento. Lo realiza una metaloproteínasa de la familia BMP-1/TLD. Separa la unión no covalente y da lugar a la miostatina madura, que es capaz de unirse a sus correspondientes receptores y realizar su actividad biológica. Fuente: autora

El principal papel fisiológico de la miostatina es la regulación negativa de la masa muscular y su reparación, inhibiendo la proliferación y la diferenciación y estimulando la supervivencia celular [3], [11]–[14]. Esto sugiere que la miostatina es expresada de forma normal en el organismo para limitar el crecimiento corporal y el tamaño del corazón [15].

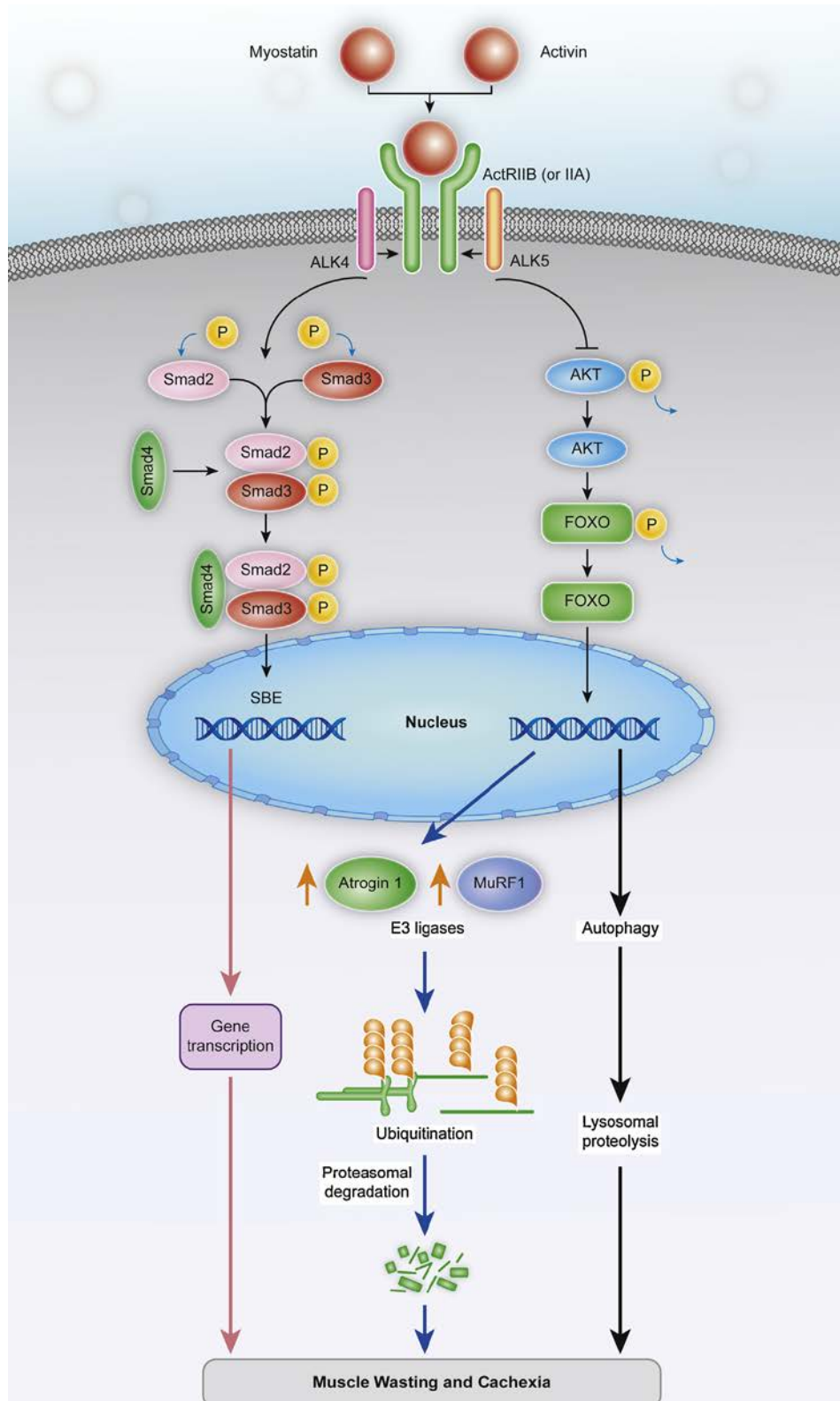


Figura 2: Señales intracelulares activadas por la unión de la miostatina a su receptor. Al unirse la miostatina a su receptor, se activan una serie de cascadas intracelulares que finalizan con la expresión de genes en el núcleo relacionados directamente con el desgaste muscular y la caquexia y otros que promueven la ubiquitinación y la proteólisis lisosomal. Fuente: [10]

Sin embargo, se encuentran niveles de miostatina elevados en numerosos procesos patológicos relacionados con la pérdida de masa muscular, como son: diabetes, EPOC, enfermedad hepática crónica, enfermedad renal crónica, insuficiencia cardíaca, SIDA, exceso de glucocorticoides (como sucede en la enfermedad de Cushing), caquexia cancerosa, sarcopenia, distrofias musculares (como la distrofia muscular de Duchenne), pérdida de inervación neuronal (denervación, enfermedad de la motoneurona, etc) y atrofia por desuso (encamamiento, inmovilización, viajes espaciales, etc) [7], [10], [16], [17]. La pérdida de función muscular se relaciona con un descenso de la calidad de vida, una peor tolerancia a los tratamientos y un peor pronóstico, aumentando la morbilidad y la mortalidad de los pacientes [16], [18], [19]. Por este motivo, se está investigando la utilidad de la miostatina y de moléculas relacionadas como biomarcadores para el diagnóstico o seguimiento de algunas de estas enfermedades [20]–[25].

En diversos modelos animales se ha comprobado que la inhibición de la miostatina o de sus vías de señalización produce un marcado aumento de la masa muscular y de la fuerza. Esto sucede mediante la activación y proliferación de células satélite y la hipertrofia e hiperplasia de las fibras musculares [1], [3], [26], [27]. Se acompaña de una disminución del tejido adiposo y un aumento de la masa ósea, posiblemente por la mayor carga muscular y el gasto metabólico superior [8], [28]. Parece ser la opción más prometedora para prevenir el desgaste de los músculos normales en lugar de los músculos defectuosos por anomalías genéticas o por falta de inervación [16], [29]. Estos hallazgos han llevado al desarrollo de varias moléculas capaces de bloquear la acción de la miostatina para tratar o prevenir los procesos patológicos mencionados. En general, su actividad se basa en: a) bloqueo de la unión de la miostatina a su receptor mediante moléculas que se ligan directamente a ella (inhibidores de miostatina) o b) unión a componentes del receptor. En cualquier caso, también se consigue el bloqueo de otras moléculas, ya que se conoce que algunas proteínas que se unen a la miostatina, como la folistatina, también lo hacen a otros factores de crecimiento. Además, el receptor cuenta con otros ligandos diferentes de la miostatina [30]. Actualmente, se están llevando a cabo diferentes ensayos clínicos que cuentan con voluntarios sanos y pacientes. Por otro lado, las autoridades reguladoras de medicamentos en Estados

Unidos y en Europa (*Food & Drug Administration* y *European Medicines Agency*) han otorgado la designación de “tratamiento innovador” y “medicamento huérfano”, respectivamente, a una de estas moléculas para el tratamiento de la miositis por cuerpos de inclusión [31]. Se trata de un anticuerpo del receptor de la miostatina ActRIIB (*Activin receptor IIB*), denominado bimagrumab/BYM338 (Novartis®) [32]–[34]. Bimagrumab también está siendo evaluado en ensayos clínicos en pacientes con EPOC, caquexia cancerosa y sarcopenia [30], [32]. Bimagrumab compite con la miostatina y otros ligandos (como activina A y GDF-11) por la unión a dicho receptor, inhibiendo las cascadas de señalización celular que se desencadenan tras la interacción [35].

Por último, a pesar de las prometedoras aplicaciones de las moléculas que bloquean la actividad de la miostatina, se plantea la posibilidad del uso ilícito de estas sustancias por parte de deportistas que busquen mejorar su condición física [36], [37]. Debido a esto, la Agencia Mundial Antidopaje (AMA) prohibió los fármacos modificadores de la función de la miostatina en 2008 [38]. Aparte de las cuestiones éticas, estas moléculas aún no han sido comercializadas y, en algunos casos, han provocado efectos secundarios que hicieron necesario interrumpir los ensayos clínicos que se estaban realizando. Algunos de los potenciales riesgos para la salud que entraña la supresión de la miostatina son: la reducción de las funciones cardíaca y respiratoria por hipertrofia del músculo cardíaco y de los músculos respiratorios [39]; y la lesión de tendones y huesos por sobrecarga debida al crecimiento excesivo de la masa muscular [40]. Además, no existe certeza de que el aumento de masa muscular que se consigue, se acompañe de un aumento de función y fuerza en humanos [41]. Varios inhibidores de la miostatina diseñados con fines terapéuticos se encuentran en estadios avanzados de ensayos clínicos, lo que sugiere que su llegada al mercado puede ser un hecho dentro de unos años. Hoy en día, ante la próxima celebración de competiciones deportivas a nivel mundial y a pesar de los recursos destinados por la AMA, gobiernos nacionales y diversas instituciones, no se ha comercializado ningún método de detección de inhibidores de miostatina en controles antidopaje [41].

4. OBJETIVOS

En este trabajo de investigación se pretende producir, empleando técnicas de DNA recombinante, miostatina humana mediante su fusión a una cola de polihistidina y empleando como vehículo de expresión una línea celular humana (HEK293). También se discute la utilidad de la miostatina como biomarcador de ciertos procesos patológicos y los sistemas disponibles para la detección de inhibidores de la actividad de miostatina en controles antidopaje.

5. DESARROLLO DEL TRABAJO

Línea celular. Se utilizaron células HEK293 (del inglés *human embryonic kidney*) (293 Cell Line Human, Sigma-Aldrich®) [42] como vehículo de expresión de la miostatina recombinante. Se cultivaron en frascos de Roux ventilados de 75 cm² y se conservaron en una incubadora a 37°C con una atmósfera humidificada al 5% de CO₂. Para su mantenimiento se realizaron pases cada 48 h, momento en que las células tenían aproximadamente un 80% de confluencia. Se retiraba el medio de cultivo (DMEM con suero bovino fetal al 10%, 2 mM de L-glutamina y 100 µg/ml de ampicilina y 100 µg/ml de estreptomicina) y se lavaba con PBS/EDTA. Posteriormente, se incubaba 5-10' con 6 ml de PBS/EDTA y 50 µl de tripsina. Después se añadían 6 ml de medio de cultivo y se centrifugaba a 2000 rpm durante 5'. Se retiraba el sobrenadante y se resuspendía el sedimento de células en 4 ml de medio. En una placa nueva se añadían 8 ml de medio y 0'5 ml de células resuspendidas y se introducía en la incubadora hasta nuevo uso. (Todos los reactivos empleados en cultivo celular eran de Gibco®, Thermo Fisher Scientific)

Cepa bacteriana. Se utilizó la cepa *Escherichia. coli* que se recoge a continuación [Tabla 1]:

Cepa bacteriana	Genotipo	Fuente
<i>E. coli</i> químicamente competente	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ(araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	One Shot®, TOP10 Competent Cells (Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific)

Tabla 1: Cepa bacteriana empleada para la clonación de plásmido. Se trata de una cepa comercial de *E. coli* preparada para ser transfectada. Se utilizó para clonar el plásmido conteniendo el gen de miostatina humana, pPIC9/(His)₆MSTN y el plásmido recombinante de interés pcDNA3/(His)₆MSTN.

Plásmidos. Los fragmentos empleados para la obtención de DNA recombinante se obtuvieron a partir de los siguientes plásmidos:

- **Vector pcDNA3:** plásmido vector de clonación (Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific). Contiene un gen marcador de ampicilina y un lugar de restricción múltiple [Figura 3].
- **pPIC9/(His)₆MSTN:** plásmido pPIC9 [Figura 4] que alberga el inserto de clonación (His)₆MSTN. Se trata del gen de la miostatina humana marcado para expresar 6 aminoácidos de histidina en su extremo N-terminal (cola de polihistidina o *His-tag*). Sirve para la purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad, como se explicará más adelante. En el laboratorio se disponía de una muestra congelada de *E. coli* químicamente competente ya transformada con este plásmido.

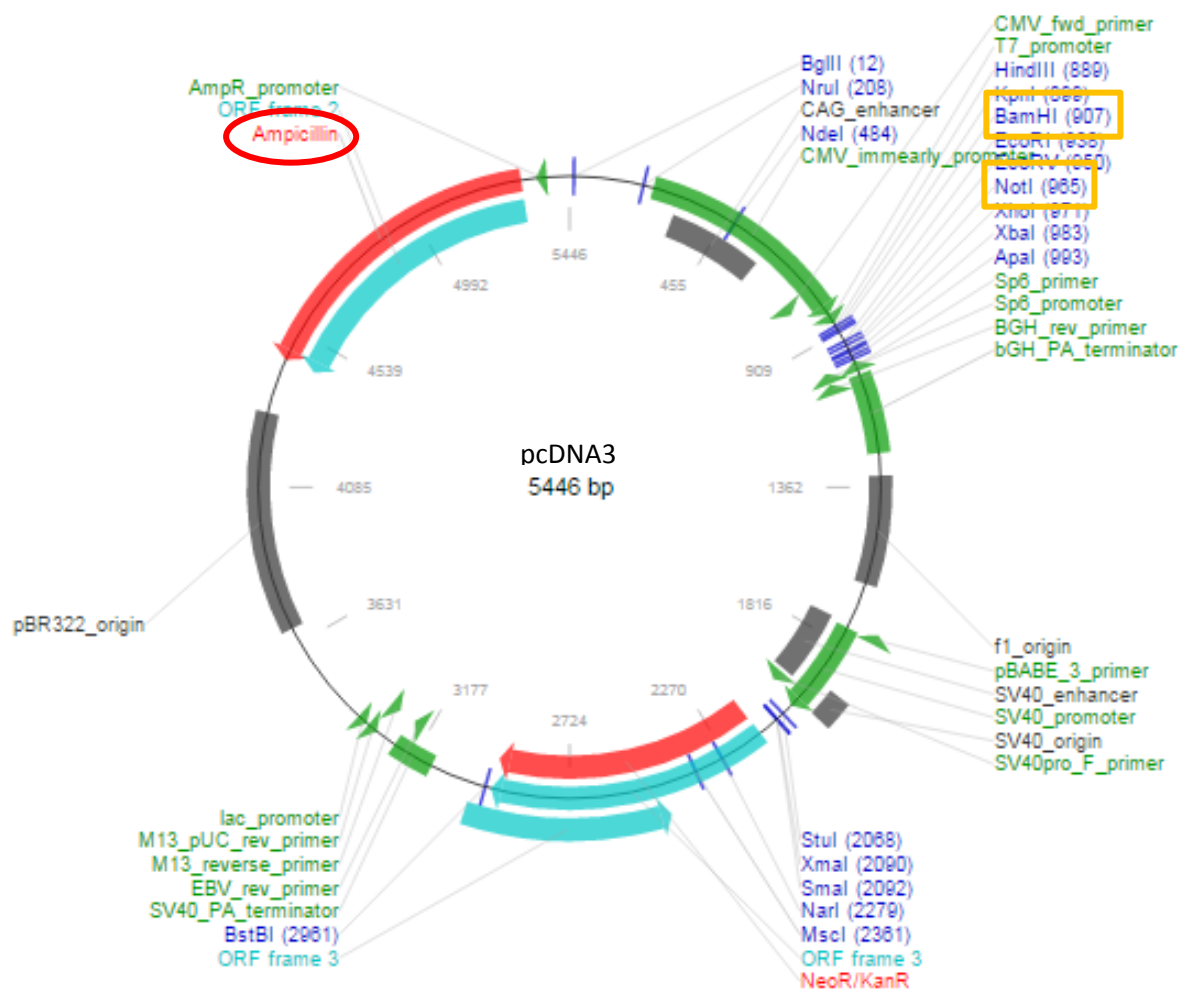


Figura 3: Mapa del plásmido pcDNA3. Contiene un gen marcador de ampicilina que permite el crecimiento de las bacterias que lo expresen correctamente. También cuenta con numerosos puntos de restricción en un sitio de clonación múltiple. La restricción se realizó en BamHI y NotI, como se verá más adelante. Fuente: addgene [43].

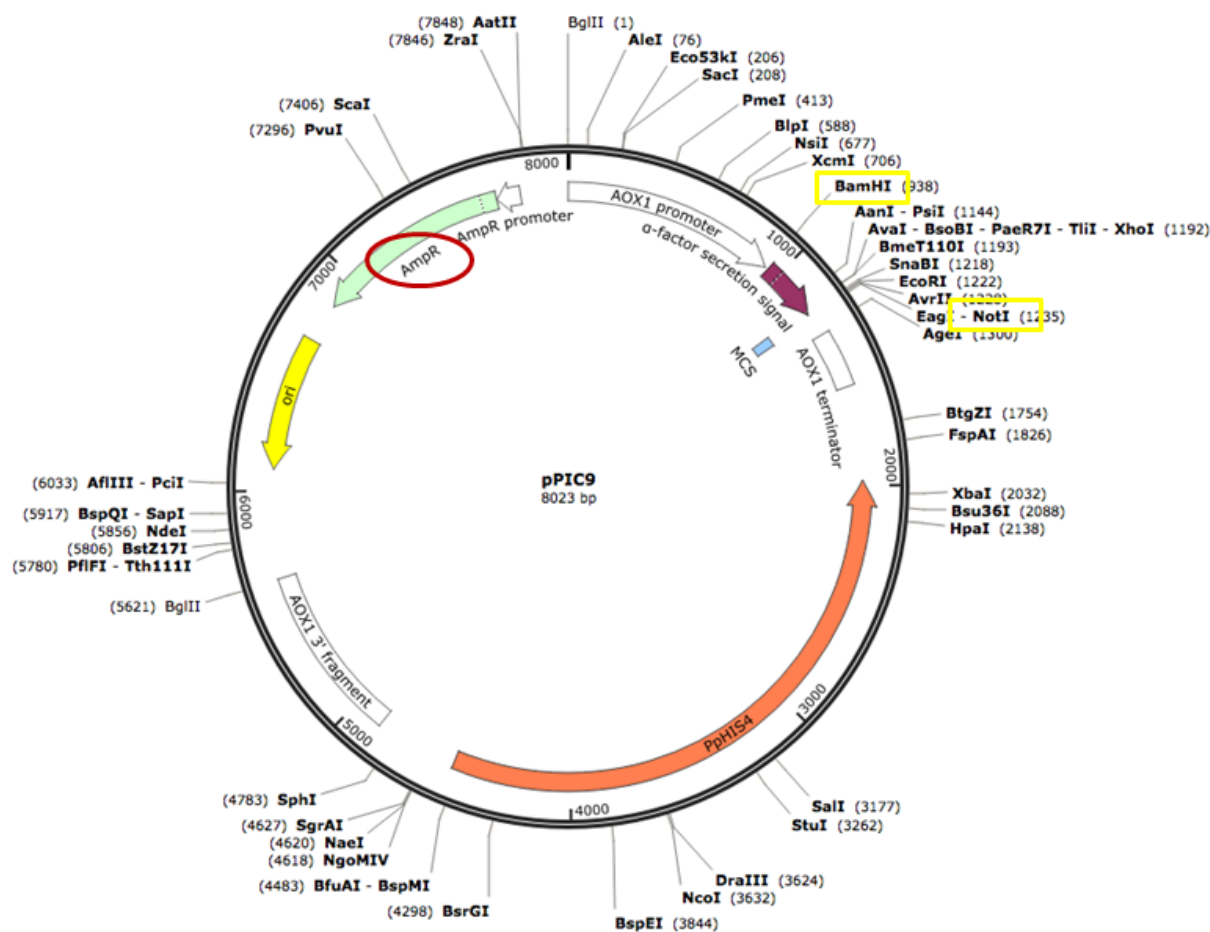


Figura 4: Mapa del plásmido pPIC9. Es el plásmido vector del inserto de clonación (His)₆MSTN, situado entre los sitios de restricción BamHI y NotI. Tiene un gen marcador de ampicilina que diferencia el crecimiento de las bacterias que expresen el plásmido. Se utilizó para transformar una cepa de *E. coli* que expresara el plásmido de forma estable. Fuente: snapgene [44]

5. 1 Obtención de DNA recombinante

5. 1. 1 Purificación del plásmido pPIC9/(His)₆MSTN

Se cultivó *E.coli* transformada con el plásmido pPIC9/(His)₆MSTN en medio Luria-Bertani (LB) (1 g de triptona, 0'5 g de extracto de levadura y 0'5 g de NaCl/100 ml) con 0'1% de ampicilina (100 µg/mL). Se incubó toda la noche a 37°C en agitación constante. Al estar marcado con un gen de resistencia a ampicilina, sólo las bacterias que expresaron dicho plásmido correctamente fueron capaces de crecer en el medio de cultivo. Se purificó el plásmido empleando un kit comercial de

extracción de DNA plásmidico (GenElute® HP Plasmid Miniprep Kit, Sigma-Aldrich®) y se determinó su concentración utilizando el instrumento de medida NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific). Se obtuvo una $[pPIC9/(\text{His})_6\text{MSTN}] = 90'1 \text{ ng}/\mu\text{L}$. Se congeló a -20°C para su conservación.

5. 1. 2 Restricción: obtención del vector pcDNA3 y del inserto $(\text{His})_6\text{MSTN}$

La restricción es una técnica de DNA recombinante que consiste en hidrolizar los enlaces fosfodiéster que unen los ácidos nucleicos que conforman las cadenas de DNA. Las enzimas que realizan este proceso se denominan enzimas de restricción o restrictasas. Tienen la capacidad de reconocer secuencias específicas de nucleótidos, denominados sitios de restricción, unirse a ellos o cerca de ellos y cortar el DNA. Los sitios de resticción son secuencias cortas y palindrómicas [45]. Se emplearon BamHI y NotI como enzimas de restricción en ambos plásmidos. Estas dan lugar a extremos cohesivos en las moléculas de DNA que cortan.

Se combinaron por separado 5 μL de pcDNA3 y 14 μL de pPIC9/ $(\text{His})_6\text{MSTN}$ con 0'5 μL de BamHI, 1'2 μL de NotI, 2 μL de 10xNEBuffer 3 y 2 μL de 10xBSA. Se completó con dH₂O hasta igualar cada mezcla a un volumen final de 20 μL . Después, se incubó durante 1 h a 37°C .

Para separar el vector pcDNA3 y el inserto $(\text{His})_6\text{MSTN}$ de sus respectivas mezclas, se realizó una electroforesis en gel de agarosa. La electroforesis es una técnica que permite la separación de moléculas en función de su tamaño. El gel puede ser de poliacrilamida o agarosa y se prepara con una concentración determinada dependiendo del tamaño de las moléculas presentes en las muestras. Los geles de agarosa son más porosos, por lo que se emplean para separar moléculas de tamaños grandes. El DNA posee carga negativa a pH neutro o alcalino, por lo tanto, cuando las moléculas de DNA son lineales, su tamaño depende solamente del número de pares de bases. La separación se produce debido a la capacidad de las moléculas cargadas de desplazarse en un campo eléctrico, con una velocidad inversamente proporcional a su tamaño [45].

Se preparó un gel de agarosa 1'5% que se hizo correr a 100 V durante 1 h. Posteriormente, se empleó el compuesto fluorescente intercalante SYBR® Gold

(Thermo Fisher Scientific) para la visualización de las moléculas separadas empleando luz UV. Se cortaron los fragmentos de gel de agarosa correspondientes a pcDNA3 y a (His)₆MSTN y se pesaron. Para extraer el DNA embebido en el gel, se siguió el protocolo de un kit comercial para la purificación de DNA en gel de agarosa (QIAEX II® Gel Extraction Kit, QIAGEN). Después, se midieron las concentraciones de DNA: [pcDNA3]: 19'3 ng/μl y [(His)₆MSTN]: 8'9 ng/μl.

5. 1. 3 Ligación: obtención del plásmido recombinante pcDNA3/(His)₆MSTN

En la ligación se combinan fragmentos de material genético de diferente origen. Una enzima ligasa es la encargada de realizar la unión covalente del inserto con el vector. Se emparejan los extremos con secuencias compatibles y la ligasa une las mellas. Para evitar asociaciones indeseadas (recircularización, unión de más de dos moléculas, etc) se recurre a dos enzimas diferentes para realizar la escisión de los fragmentos [45].

Para la obtención del plásmido recombinante de interés pcDNA3/(His)₆MSTN, se combinaron 50 ng de vector pcDNA3 y 40 ng de inserto (His)₆MSTN con 1 μl de ligasa T4. Se completó la solución hasta un volumen final de 10 μl con 5 μl de *rapid ligation buffer* y 1 μl dH₂O. Se incubó durante toda la noche en un frigorífico a 4°C.

5. 2 Clonación de DNA recombinante

5. 2. 1 Transformación bacteriana

Se denomina transformación bacteriana al proceso por el cual se introduce material genético foráneo en el interior de una célula bacteriana que posteriormente se incorpora a su genoma de una forma heredable. Para ello, la bacteria debe ser competente, es decir, debe tener la capacidad de captar material genético y de ser transformada.

Para transformar 100 μl de *E. coli* químicamente competente, se combinó con la solución de ligación que contiene el plásmido recombinante pcDNA3/(His)₆MSTN, y se utilizó el método del choque térmico o "*heat shock*" [46]: a) se enfrió el tubo en

hielo durante 20', b) tras esto, se calentó a 42°C en un termobloque durante 1' c) pasado este tiempo, volvió a situarse en hielo durante 5'. Después, se agregaron 800 µl de medio LB líquido y se dejó en agitación durante 1 h.

5. 2. 2 Selección y cultivo de transformantes

Se cultivó esta solución de *E. coli* transformada en placas de Petri con agar LB tratado previamente con ampicilina, para restringir el crecimiento sólo a aquellas bacterias capaces de expresar correctamente el plásmido recombinante pcDNA3/(His)₆MSTN. Se incubaron en una estufa a 37°C toda la noche. Al día siguiente, se seleccionaron tres transformantes y se cultivaron en respectivos tubos de ensayo con medio LB 0'1% de ampicilina. Se dejaron crecer en agitación durante toda la noche a 37°C en la estufa.

5. 2. 3 Purificación de pcDNA3/(His)₆MSTN clonado

Se extrajo el plásmido recombinante producido por los transformantes seleccionados empleando un kit comercial. Se midió la concentración de DNA de cada una de las tres muestras, obteniendo: M1[pcDNA3/(His)₆MSTN]: 194'0 ng/µl; M2[pcDNA3/(His)₆MSTN]: 251'1 ng/µl y M3[pcDNA3/(His)₆MSTN]: 227'8 ng/µl. Por último, para comprobar que el plásmido obtenido era el adecuado, se realizó la restricción nuevamente con las mismas enzimas BamHI y NotI, se separaron los fragmentos mediante electroforesis en gel de agarosa 1'5% y se enviaron al laboratorio *GATC Biotech* (<https://www.gatc-biotech.com/en/index.html>) para su secuenciación (datos no mostrados).

5. 3 Expresión de DNA recombinante

5. 3. 1 Transfección de HEK293

Se conoce como transfección al proceso por el cual se introduce material genético en células eucariotas (organismos eucariotas superiores), usualmente empleando herramientas no víricas, como los plásmidos. La transfección puede dar lugar a cambios genéticos temporales, que son aquellos en los que el material

genético no se integra en el genoma de la célula huésped, de manera que los genes transfectados se expresan durante un período de tiempo limitado (se pierden debido a las múltiples divisiones o a condiciones ambientales); o estables, en los que el material genético se integra en el genoma de la célula huésped [47]. Existen diversas técnicas de transfección dependiendo de los materiales empleados como vehículos. La transfección de las células HEK293 se realizó mediante liposomas, utilizando el reactivo comercial Lipofectamine® 2000 (Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific). Dicho método se fundamenta en la encapsulación de moléculas de DNA mediante lípidos catiónicos, formando liposomas que se fusionan con la membrana lipídica y liberan el DNA en el citosol celular [48].

En primer lugar, un día antes de la transfección, se sembraron células para que tuvieran una confluencia del 85-90%. Al día siguiente, se combinaron 50 µl de lipofectamina con 3 ml de medio DMEM sin suero bovino. Por otro lado, se mezcló más medio con el volumen correspondiente a 20 ng de plásmido recombinante pcDNA3/(His)₆MSTN. Se juntaron ambas mezclas y se incubó durante 20'. En ese tiempo, se retiró el medio de las células y se lavó con PBS dos veces. Después, se añadió la mezcla de transfección gota a gota, asegurando que toda la superficie quedaba cubierta. Se dejó reposar en la incubadora durante la noche y se cambió el medio al día siguiente. Se incubó otras 48 h. Pasado este tiempo, se transfirió el medio a un tubo y se centrifugó tres veces sucesivas a 300 g 5', 1500 g 5' y 15000 g 10'. Entre la primera y la segunda centrifugación, se cambió el tubo. Por último, se eliminaron las células presentes en el medio colectado filtrándolo en condiciones de esterilidad. Para ello, se utilizaron filtros estériles con un tamaño de poro de 0'22 µm (Cole-Parmer® Sterile CA Syringe Filters).

5. 3. 2 Purificación de la proteína recombinante: cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados

La cromatografía de afinidad es un método de aislamiento de un producto deseado en el seno de una mezcla compleja. Se fundamenta en interacciones específicas y reversibles existentes entre dos moléculas, como por ejemplo enzimas y sustratos o antígenos y anticuerpos. Para ello, se sitúa una de las moléculas (ligando) en una matriz inmóvil (fase estacionaria), mientras que la molécula que

interesa aislar (diana) se encuentra en un medio líquido (fase móvil). La fase móvil se hace pasar a través de la fase estacionaria [49].

Se empleó como fase estacionaria un gel comercial (HIS-Select® Nickel Affinity Gel, Sigma-Aldrich®) constituido al 6% por esferas de agarosa con residuos de ácido nitrilotriacético (NTA), que actúa como agente quelante de iones de níquel divalente (Ni^{2+}). De esta forma, los iones de níquel quedan unidos mediante cuatro enlaces a la columna, haciendo muy difícil su desprendimiento. Los dos enlaces restantes interaccionan con residuos de histidina que se encuentren de forma consecutiva en una cadena poliaminoacídica. Sirve para purificar proteínas tanto en su forma nativa como desnaturalizada [50]. En este estudio, la miostatina recombinante que se expresó estaba fusionada en su extremo N' a una cola de polihistidina [Figura 5].

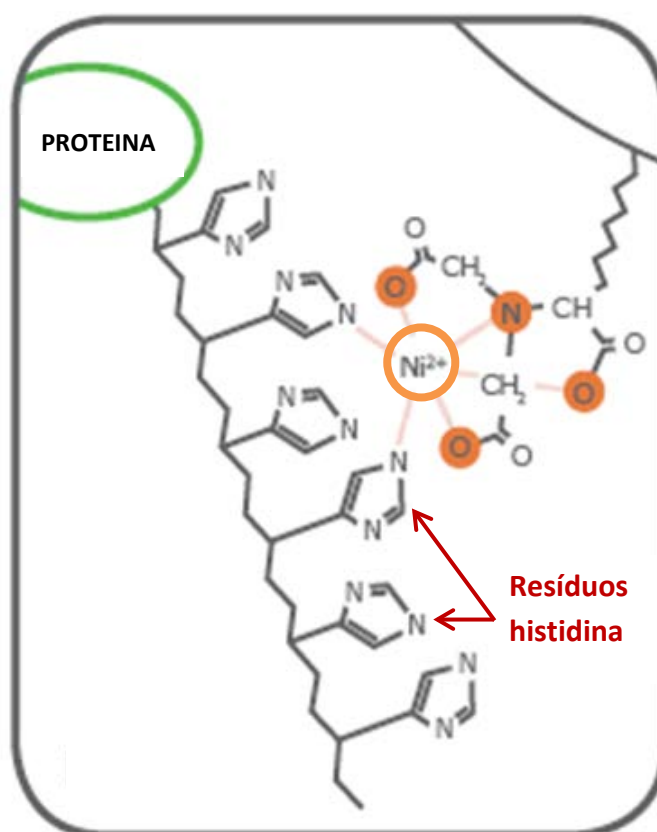


Figura 5: Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados. Estructura de la resina NTA quelante de iones de Ni^{2+} . Los iones se fijan mediante cuatro enlaces a la columna, mientras que los dos enlaces restantes se unen a los aminoácidos de histidina de las proteínas de fusión con colas de polihistidina. De esta forma las inmovilizan selectivamente para su posterior elución y purificación. Fuente: [51]

En primer lugar, se lavó la columna con dH₂O para eliminar los restos de etanol al 30% que se emplea para su conservación. Seguidamente, se activó la columna con 3 ml de *buffer* de equilibrio. Este sirve para igualar el pH de la columna al de la muestra. Es necesario para que se forme el complejo entre los iones de níquel y las colas de polihistidina. De otro modo, la proteína diana sería eliminada junto al resto de la mezcla. Cuando el *buffer* de equilibrio hubo atravesado toda la fase estacionaria, se cargó la columna con 2 ml de muestra, dejando un tiempo de incubación de 10' entre cada mililitro. Una vez eluida la muestra, se añadió el *buffer* de lavado y se tomaron 6 alícuotas de un mililitro cada una. En este paso se trata de lavar la columna de aquellas proteínas que no han interactuado con la fase estacionaria. Por último, se utilizó el *buffer* de elución y se tomaron varias alícuotas de 0'5 ml cada una. Las soluciones *buffer* empleadas fueron elaboradas en el laboratorio como se detalla en la siguiente tabla [Tabla 2]:

<i>Buffer</i> de equilibrio	<ul style="list-style-type: none"> • 50 ml de PBS 1x
<i>Buffer</i> de lavado	<ul style="list-style-type: none"> • 2'2 ml de buffer de elución • 47'8 ml de buffer de equilibrio
<i>Buffer</i> de elución	<ul style="list-style-type: none"> • 45 ml de PBS 1x • 0'85 g de imidazol • Calibrar pH hasta 7'4 con HCl • Completar hasta un volumen final de 50 ml con más PBS 1x

Tabla 2: Composición de las soluciones *buffer* empleadas en la cromatografía de afinidad. *Buffer* de equilibrio: iguala las condiciones de la fase estacionaria a las de la muestra (fase móvil). *Buffer* de lavado: elimina las moléculas que no se han unido a la fase estacionaria. *Buffer* de elución: rompe las uniones que se establecen entre los iones Ni de la fase estacionaria con los residuos de histidina, de esta manera se eluye la proteína de interés.

Se utilizó el método de Bradford [52] para detectar la presencia de proteínas en las muestras obtenidas en la cromatografía de afinidad. Se tomaron alícuotas de

50 µl de las fracciones eluidas y se combinaron con 300 µl de azul Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250 Dye, Thermo Fisher Scientific) en una microplaca. Se dejó en agitación durante 10'. Seguidamente, se midieron las absorbancias a $\lambda=595\text{nm}$. Se seleccionó la muestra de proteína recombinante eluida que presentaba mayor absorbancia para su posterior análisis mediante electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (*SDS-PAGE*) y transferencia Western (o *Western blot*).

5. 3. 3 Análisis de la proteína recombinante: gel de poliacrilamida con SDS y transferencia Western

La electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS separa las proteínas de una muestra únicamente en función de su masa molecular, de manera que, aquellas proteínas de menor masa molecular recorrerán una distancia mayor y viceversa.

Se elaboró un gel de poliacrilamida de 1'5 mm de grosor con SDS al 15% [Tabla 3]. Se realizó la electroforesis a 100 V durante 1h y 30'.

1x gel (1'5 mm)	Gel de resolución	Gel de apilamiento
dH₂O	3'44 ml	2'92 ml
Tris/HCl	(pH 8'8) 2 ml	(pH 6'8) 500 µl
Bis-acrilamida 40%	2'4 ml	500 µl
SDS 10%	80 µl	40 µl
APS 10%	80 µl	40 µl
TEMED	3'2 µl	4 µl

Tabla 3: Composición del gel de poliacrilamida con SDS empleado para el análisis de la miostatina recombinante purificada en la cromatografía de afinidad.

Las proteínas están embebidas en el seno del gel, por lo que no se puede realizar su detección. Es necesario adherirlas a la superficie de una membrana para que estén accesibles. La transferencia se realiza aplicando un campo eléctrico de forma perpendicular al gel. Este proceso se denomina transferencia Western [53]. Posteriormente es necesario revelar la membrana empleando ligandos específicos a la proteína de interés.

Se realizó la transferencia desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa empleando una corriente eléctrica de 100 V durante 1 h y 30'. Seguidamente, se bloqueó la membrana con leche desnatada en polvo al 5% en PBS 1x y se dejó actuar toda la noche. Esto evita que el ligando utilizado se una de forma inespecífica a la membrana. Al día siguiente, se realizó la detección de las proteínas con los anticuerpos detallados a continuación [Tabla 4]:

Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
<ul style="list-style-type: none"> • Anticuerpo anti-histidina (Anti-His Antibody, GE Healthcare Life Sciences®). • Unión selectiva a colas de 6 residuos de histidina. • Producido en ratones. 	<ul style="list-style-type: none"> • Anticuerpo anti-IgG de ratón (Anti-Mouse IgG – Alkaline Phosphatase, Sigma-Aldrich®). • Unión a IgG de ratón. • Conjugado con fosfatasa alcalina. Su sustrato (SIGMAFAST™ BCIP®/NBT tablets, Sigma-Aldrich®) genera una respuesta colorimétrica. • Producido en conejo.

Tabla 4: Anticuerpos primario y secundario empleados en la detección de miostatina recombinante fusionada a una cola de polihistidina.

En primer lugar, se lavó el agente bloqueante con PBS 1x. Seguidamente, se añadió el anticuerpo primario (1:3000) con *buffer* de incubación y se dejó actuar 1 h y 30'. Tras esto, se realizaron tres lavados de 10' cada uno con PBS 1x y 0'05% de Tween-20. Seguidamente, se agregó el anticuerpo secundario (1:30000) con *buffer*

de incubación durante 1 h. Después, se lavó otras tres veces empleando el procedimiento anterior antes de utilizar el sustrato de la fosfatasa alcalina. Se cubrió la membrana de nitrocelulosa con la solución sustrato y se dejó actuar durante 10'. Finalmente, se lavó varias veces con agua para eliminar los restos. El buffer de incubación empleado con los anticuerpos primario y secundario estaba compuesto por PBS 1x al 0'05% de Tween-20 y 3% de leche desnatada en polvo. En la siguiente imagen se muestra la membrana tras el revelado con el anticuerpo anti-histidina [Figura 6]:

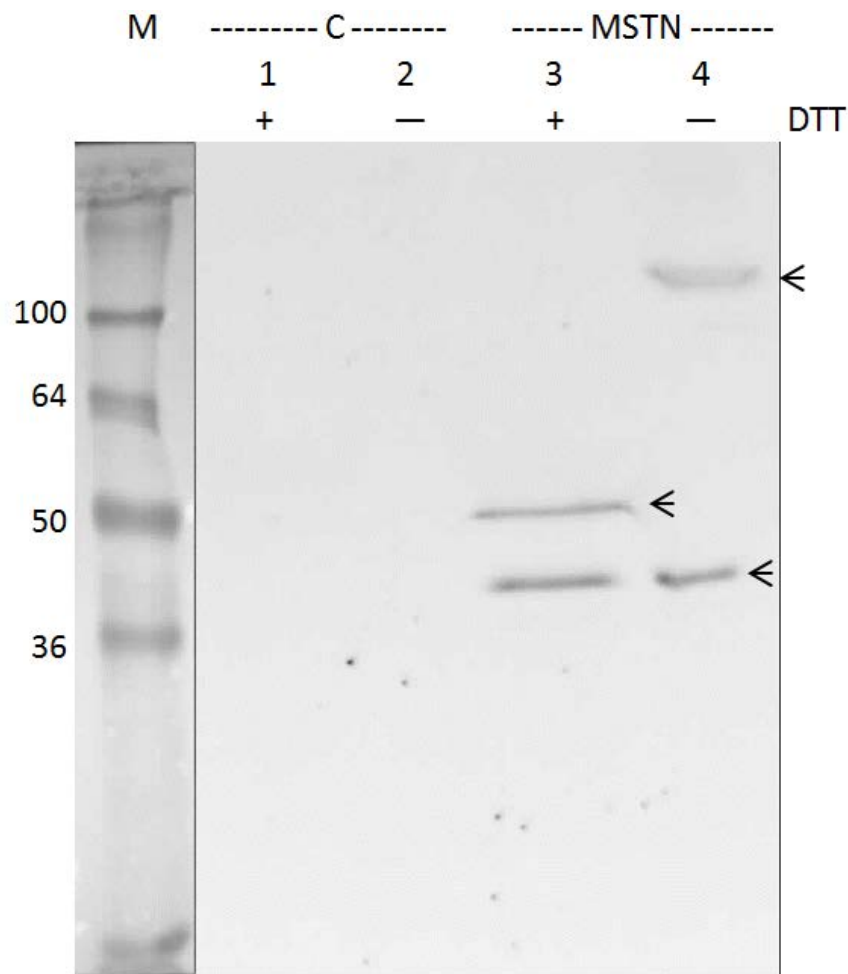


Figura 6: Membrana revelada con anticuerpo anti-histidina. M: marcador de peso molecular (kDa); C: control, medio aislado de células HEK293 no transfectadas; MSTN: medio de células HEK293 transfectadas con plásmido pcDNA3/(His)₆MSTN. Los carriles + fueron tratados con ditiotreitol (DTT) (condiciones reductoras). Los carriles - no fueron tratados con DTT. Carriles 1 y 2: no detección porque no se expresó (His)₆MSTN. Carril 3: bajo condiciones reductoras, banda de 51 kDa correspondiente a una molécula de propéptido ligada al monómero de miostatina y banda de 38 kDa correspondiente al propéptido. Carril 4: sin condiciones reductoras, banda de 102 kDa correspondiente a promiostatina y banda de 38kDa correspondiente al propéptido.

Se empleó medio de cultivo aislado de células HEK293 sin transfectar como control (C) del experimento (carriles 1 y 2). Las muestras analizadas (MSTN, carriles 3 y 4) consistían en medio aislado de células HEK293 transfectadas con el plásmido recombinante que posteriormente se purificó mediante cromatografía de afinidad por iones inmovilizados. Además, las bandas 1 y 3 fueron tratadas con ditioneitol (DTT) 1 M. Se trata de un agente reductor muy potente capaz de romper enlaces disulfuro, como los que forman el homodímero de la miostatina madura. En las bandas no tratadas, se añadió un volumen equivalente de dH_2O . Como cabía esperar, en el control no se detectó ninguna proteína con cola de histidina. Se obtuvieron bandas de peso molecular aparente de unos 51 kDa y de 38 kDa en el carril 3 (sometido a condiciones reductoras) y de 102 kDa y 38 kDa en el carril 4.

6. DISCUSIÓN

Los resultados detallados en la figura 6 concuerdan con los hallazgos realizados en otros trabajos. En primer lugar, McPherron y su equipo describen una molécula de unos 102 kDa cuando aislan la miostatina por primera vez en ratones [1]. Se trata de la forma en la que la proteína es secretada al espacio extracelular (promiostatina). Está constituida por dos moléculas de propéptido ligadas de forma no covalente al homodímero de la miostatina madura. Al añadir DTT a la muestra, se rompe el enlace disulfuro que conforma el homodímero de miostatina, por lo que aparece una banda de unos 51 kDa, correspondiente a una molécula de propéptido ligada de forma no covalente a un monómero de miostatina. Además, tanto en condiciones reductoras como no reductoras, aparecen dos bandas con un peso molecular aparente de alrededor de 38 kDa, que se identifica como propéptido no unido a miostatina. Esto indica que se trata de un monómero, hecho que ha sido documentado con anterioridad por Thies *et al.* y Jiang *et al* [54], [55]. Al igual que en sus trabajos, la diferencia del peso aparente del propéptido con respecto al peso molecular estimado de 28 kDa puede deberse a su glucosilación. Por otro lado, no figuran las bandas correspondientes al homodímero (26 kDa) ni al monómero (13 kDa) de miostatina que aparecen en condiciones no reductoras y reductoras, respectivamente, y descritas por Cadavid *et al.* y Thies *et al* [2], [54]. La explicación es que la proteína recombinante diseñada tenía la cola de polihistidina fusionada al extremo N terminal de la molécula, correspondiente a la parte del propéptido. Por lo tanto, las formas homodimérica y monomérica de la miostatina fueron eliminadas durante la cromatografía de afinidad o no se detectaron al revelar la membrana porque se empleó un anticuerpo anti-histidina.

Aunque el perfil proteico obtenido es similar a otros descritos para la miostatina, se podrían realizar pruebas complementarias para la caracterización de la proteína recombinante purificada. Un ejemplo sería expresar la misma proteína recombinante de miostatina humana con la cola de polihistidina fusionada al extremo C terminal. La secuenciación aminoacídica confirmaría casi sin margen de error si se trata o no de miostatina.

La miostatina humana es sometida a varias modificaciones después de su traducción y también es secretada al espacio extracelular. Por ello, la glucosilación, los cortes proteolíticos en lugares determinados y la formación de enlaces disulfuro son esenciales para su plegamiento correcto, su llegada a los receptores diana y su actividad biológica. Clásicamente se ha descrito la expresión de la miostatina humana empleando sistemas basados en roedores [1], [54], [55]. Por este motivo, se decidió emplear como vehículo de expresión las células HEK293, ya que se trata de una línea celular humana [42]. Estos sistemas de expresión humanos se están utilizando con mayor frecuencia ya que son capaces de producir proteínas recombinantes humanas con modificaciones postraduccionales idénticas a las células que las producen de forma natural [56]. Hoy en día, las células HEK293 se emplean para producir proteínas a escala industrial, como los factores de la coagulación VIII y IX, la hormona del crecimiento y citocinas, entre otros ejemplos. La principal desventaja de las líneas celulares humanas es el coste del producto final [57]. Así mismo, se ha reportado que HEK293 se trata de una línea celular robusta y fácil de mantener de la que se obtienen rendimientos elevados de transfección y producción proteica [42], [58], [59].

Un biomarcador se define como aquella característica biológica que puede ser medida y evaluada como un indicador de un proceso biológico normal, una patología o una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica. Debe poder ser aislado de tejidos, células o fluidos y debe contar con un método de detección tanto sensitivo como específico y altamente reproducible en otros laboratorios [60]. En lo referente al uso de miostatina como biomarcador de enfermedades que cursan con pérdida de masa muscular y atrofia, no existe consenso hoy en día. Se ha estudiado su utilidad como biomarcador de Diabetes Mellitus tipo II, insuficiencia renal crónica, EPOC, distrofia muscular de Duchenne, sarcopenia y caquexia cancerosa [21]–[25], [61]–[63]. Sin embargo, los resultados de estos trabajos son contradictorios. Una explicación sería el desbalance entre los niveles circulantes de miostatina y su actividad, la falta de un método fiable para su cuantificación en suero o plasma y la participación de la miostatina en otros procesos metabólicos [62], [63]. Finalmente, todos los autores concluyen en la necesidad de diseñar más estudios al respecto.

En muchos casos, las estrategias de dopaje han sido una extensión derivada del desarrollo terapéutico, como ocurrió con la eritropoyetina o la hormona del crecimiento. La miostatina ha sido identificada por varios investigadores como diana de fármacos modificadores de su función y del dopaje genético [36], [37], [39], [64]. La AMA, gobiernos nacionales y diversas instituciones han destinado recursos para el desarrollo de controles antidopaje capaces de detectar dichas estrategias en muestras biológicas. Las tecnologías analíticas empleadas han sido, en general, espectrometría de masas y biosensores de afinidad [20], [41], [65], [66]. Aunque hoy en día no hay comercializado ninguno de estos dispositivos, tampoco existe evidencia de casos en los que se utilizaran inhibidores de la actividad de la miostatina ni dopaje genético para la potenciación ilegal de la forma física. Sin embargo, es muy importante la concienciación de los deportistas, tanto profesionales como aficionados, de los riesgos que entrañan estas prácticas [36], [39], [64].

7. CONCLUSIONES

- La línea celular humana HEK293 es adecuada para la expresión de miostatina humana recombinante fusionada a una cola de polihistidina. Prueba de ello son las bandas obtenidas en la transferencia Western y correspondientes a la promiostatina (102 kDa), a la molécula de propéptido ligada al monómero de miostatina (51 kDa) y al propéptido (38 kDa).
- Se necesitan más estudios para aclarar la utilidad de la miostatina como biomarcador de enfermedades asociadas al desgaste muscular y la atrofia.
- No hay comercializado ningún método de detección de inhibidores de miostatina en muestras biológicas para ser utilizado como control antidopaje.

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. C. McPherron, A. M. Lawler y S.-J. Lee, "Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member", *Nature*, vol. 387, no. 6628, pp. 83–90, 1997.
- [2] N. F. González-Cadavid, W. E. Taylor, K. Yarasheski, I. Sinha-Hikim, K. Ma, S. Ezzat, R. Shen, R. Lalani, S. Asa y M. Mamita, "Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting", *National Academy of Sciences USA*, vol. 95, pp. 14938–14943, 1998.
- [3] V. M. Arce, I. Carneiro, S. Fernández-Nocelo y J. Devesa, "Revisión. La miostatina: un regulador autocrino / paracrino del desarrollo muscular", *Endocrinol Nutr.*, vol. 52, no. 7, pp. 350–357, 2005.
- [4] M. Sharma, R. Kambadur, K. G. Matthews, W. G. Somers, G. P. Devlin, J. V. Conaglen, P. J. Fowke, y J. J. Bass, "Myostatin, a transforming growth factor- β superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct", *J. Cell. Physiol.*, vol. 180, no. 1, pp. 1–9, 1999.
- [5] J. M. Argilés, M. Orpí, S. Busquets y F. J. López-Soriano, "Myostatin: more than just a regulator of muscle mass," *Drug discovery today*, vol. 17, no. 13/14, 2012.
- [6] T. J. Cho, L. C. Gerstenfeld y T. A. Einhorn, "Differential temporal expression of members of the transforming growth factor β superfamily during murine fracture healing", *J. Bone Miner. Res.*, vol. 17, no. 3, pp. 513–20, 2002.
- [7] M. Sharma, C. McFarlane, R. Kambadur, y H. Kukreti, "Critical Review. Myostatin: Expanding Horizons", *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 67, no. 8, pp. 589–600, 2015.
- [8] B. K. Pedersen y M. A. Febbraio, "Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle," *Nature Reviews Endocrinology*, no. 8, pp. 457-465, 2012.
- [9] N. M. Wolfman, A. C. McPherron, W. N. Pappano, M. V Davies, K. Song, K. N.

- Tomkinson, J. F. Wright, L. Zhao, S. M. Sebald, D. S. Greenspan y S. Lee, "Activation of latent myostatin by the BMP-1/Tolloid family of metalloproteinases", *PNAS*, vol. 100, no. 26, pp. 15842–15846, 2003.
- [10] H. Q. Han, X. Zhou, W. E. Mitch y A. L. Goldberg, "Myostatin/activin pathway antagonism: Molecular basis and therapeutic potential", *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, pp. 1–15, 2013.
- [11] M. Thomas, B. Langley, C. Berry, M. Sharma, S. Kirk, J. Bass y R. Kambadur, "Myostatin, a Negative Regulator of Muscle Growth, Functions by Inhibiting Myoblast Proliferation", *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 51, pp. 40235–40243, 2000.
- [12] W. E. Taylor, S. Bhasin, J. Artaza, F. Byhower, M. Azam, D. H. J. Willard, F. C. J. Kull y N. González-Cadavid, "Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells", *Am J Physiol Endocrinol Metab*, vol. 280, no. 2, pp. 221–228, 2001.
- [13] R. Ríos, I. Carneiro, V. M. Arce y J. Devesa, "Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation", *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 282, no. 5, pp. 993–9, 2002.
- [14] R. Ríos, I. Carneiro, V. M. Arce, and J. Devesa, "Myostatin regulates cell survival during C2C12 myogenesis", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 280, no. 2, pp. 561–6, 2001.
- [15] J. C. Lui y J. Baron, "Mechanisms Limiting Body Growth in Mammals", *Endocr. Rev.*, vol. 32, no. 3, pp. 422–440, 2011.
- [16] S. Cohen, J. A. Nathan y A. L. Goldberg, "Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies", *Nat. Publ. Gr.*, vol. 14, no. 1, pp. 58–74, 2015.
- [17] T. B. Dschietzig, "Myostatin: From the Mighty Mouse to cardiovascular disease and cachexia", *Clin. Chim. Acta*, vol. 433, pp. 216–224, 2014.
- [18] E. Macdermid, G. Hooton y M. Macdonald, "Early recognition of malnutrition

and cachexia in the cancer patient : a position paper of a European School of Oncology Task Force”, *Annals of Oncology*, vol. 25, pp. 291–295, 2014.

- [19] J. M. Argiles, S. D. Anker, W. J. Evans, J. E. Morley, K. C. H. Fearon, F. Strasser, M. Muscaritoli y V. E. Baracos, “Consensus on Cachexia Definitions”, *JAMDA*, 2010.
- [20] A. Breitbart, G. M. Scharf, D. Duncker, C. Widera, J. Gottlieb, A. Vogel, S. Schmidt, G. Brandes, H. Heuft, R. Lichtinghagen, T. Kempf, C. Kai, J. Bauersachs y J. Heineke, “Highly Specific Detection of Myostatin Prodomain by an Immunoradiometric Sandwich Assay in Serum of Healthy Individuals and Patients”, *PLOS ONE*, vol. 8, no. 11, pp. 1–10, 2013.
- [21] M. A. Anaya-segura, F. A. García-martínez, L. Á. Montes-almanza, B. Díaz, G. Ávila-ramírez, I. Alvarez-maya, R. M. Coral-vázquez, P. Mondragón-terán, R. E. Escobar-cedillo, N. García-calderón, N. A. Vázquez-cardenas, S. García y L. B. López-hernández, “Non-Invasive Biomarkers for Duchenne Muscular Dystrophy and Carrier Detection”, *Molecules*, vol. 20, pp. 11154–11172, 2015.
- [22] C. Drescher, M. Konishi, N. Ebner y J. Springer, “Loss of muscle mass: Current developments in cachexia and sarcopenia focused on biomarkers and treatment”, *Int. J. Cardiol.*, vol. 202, pp. 766–772, 2016.
- [23] S. E. Park, C. Park y G. Sweeney, “Biomarkers of insulin sensitivity and insulin resistance : Past , present and future,” *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, pp. 1–11, 2015.
- [24] R. H. Mak, “Serum myostatin in patients on maintenance haemodialysis: a useful biomarker of muscle wasting ?”, *Clinical Endocrinology*, vol. 75, pp. 738–739, 2011.
- [25] C. Ju y R. Chen, “Serum myostatin levels and skeletal muscle wasting in chronic obstructive pulmonary disease”, *Respir. Med.*, vol. 106, no. 1, pp. 102–108, 2012.
- [26] S. J. Lee y A. C. McPherron, “Regulation of myostatin activity and muscle

- growth”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 98, no. 16, pp. 9306–11, 2001.
- [27] Q. Wang y A. C. Mcpherron, “Myostatin inhibition induces muscle fibre hypertrophy prior to satellite cell activation”, *J. Physiol.*, vol. 9, pp. 2151–2165, 2012.
 - [28] C. Tagliaferri, Y. Wittrant, M. Davicco, S. Walrand y V. Coxam, “Muscle and bone, two interconnected tissues”, *Ageing Res. Rev.*, pp. 1–16, 2015.
 - [29] V. Malik, L. Rodino-Klapac y J. R. Mendel, “Emerging Drugs for Duchenne Muscular Dystrophy”, *Expert Opin. Emerg. Drugs*, vol. 17, no. 2, pp. 261–277, 2012.
 - [30] R. C. Smith y B. K. Lin, “Myostatin inhibitors as therapies for muscle wasting associated with cancer and other disorders”, *Current Opinion*, vol. 7, no. 4, 2013.
 - [31] A. A. Amato, K. Sivakumar, N. Goyal, W. S. David, M. Salajegheh, J. Praestgaard, E. Lach-Trifilieff, A.-U. Trendelenburg, D. Laurent, D. J. Glass, R. Roubenoff, B. S. Tseng y S. A. Greenberg, “Treatment of sporadic inclusion body myositis with bimagrumab”, *Neurology*, vol. 83, no. 24, pp. 2239–46, 2014.
 - [32] J. M. Reichert, “Antibodies to watch in 2014,” *mAbs*, no. 6, pp. 5–14, 2014.
 - [33] European Medicines Agency. EMA, “Public summary of opinion on orphan designation Recombinant human monoclonal antibody against activin receptor type IIB for the treatment of inclusion body myositis”, [Online]. Disponible en http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Orphan_designation/2012/09/WC500133110.pdf. [Consultado: 02-Enero-2016].
 - [34] United States Food & Drug Administration. US FDA, “Breakthrough Therapy Designation: Exploring the Qualifying Criteria”, pp. 1–39, 2015.
 - [35] E. Lach-trifilieff, G. C. Minetti, K. Sheppard, C. Ibebunjo, J. N. Feige y S. Hartmann, “Skeletal Muscle Hypertrophy and Protects from Atrophy”, *MCB*, vol. 34, no. 4, pp. 606–618, 2014.

- [36] M. N. Fedoruk y J. L. Rupert, "Myostatin inhibition: a potential performance enhancement strategy?", *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sport*, vol. 18, no. 2, pp. 123–131, 2008.
- [37] S. C. Meds y M. R. Meds, "The sports doping race," *Medicine and technology*, vol. 79, no. 1, pp. 23–24, 2013.
- [38] World Antidoping Agency. WADA, "The 2008 Prohibited List", [Online]. Disponible en: https://wada-main-prod.s3.amazonaws.com/resources/files/WADA_Prohibited_List_2008_EN.pdf [Consultado: 02-Enero-2016].
- [39] T. Van Der Gonde, O. De Hon, H. J. Haisma y T. Pieters, "Gene doping: an overview and current implications for athletes", *BJSM*, pp. 1–11, 2013.
- [40] O. Paper, "Gene Doping in Sport: Perspectives", *Biol. Sport*, vol. 31, pp. 251–259, 2014.
- [41] K. Walpurgis, A. Thomas y M. Thevis, "Myostatin inhibitors in sports drug testing: Detection of myostatin-neutralizing antibodies in plasma / serum by affinity purification and Western blotting", *Proteomics Clin.*, pp. 1–11, 2015.
- [42] P. Thomas and T. G. Smart, "HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins.," *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, vol. 51, no. 3, pp. 187–200, 2005.
- [43] addgene, "Mapa plasmídico de pcDNA3" [Online]. Disponible en: <https://www.addgene.org/vector-database/2092/>. [Consultado: 28-Enero-2016].
- [44] snapgene, "Mapa plasmídico de pPIC9" [Online]. Disponible en: http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/yeast_plasmids/pPIC9/. [Consultado: 02-Febrero-2016].
- [45] Á. Herráez, *Biología molecular e ingeniería genética*, 2ª edición. Barcelona: Elsevier, 2012.
- [46] H. E. Bergmans, I. M. van Die y W. P. Hoekstra, "Transformation in Escherichia

- coli: stages in the process”, *J. Bacteriol.*, vol. 146, no. 2, pp. 564–70, 1981.
- [47] T. K. Kim y J. H. Eberwine, “Mammalian cell transfection: the present and the future”, *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 397, no. 8, pp. 3173–8, 2010.
- [48] Cultek, “Tecnología del DNA recombinante,” vol. 35, pp. 11016– 11018, 2007.
- [49] M. Urh, D. Simpson y K. Zhao, *Affinity Chromatography: General Methods*, 1ª edición, vol. 463, no. 9, Elsevier, 2009.
- [50] Sigma-Aldrich, “Technical bulletin: HIS-Select Nickel Affinity Gel” [Online]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin/p6611bul.pdf>. [Consultado: 22-Enero-2016].
- [51] G-Biosciences, “What You Need to Know About NTA and IDA Ligands” [Online]. Disponible en: <http://info.gbiosciences.com/blog/bid/200711/What-You-Need-to-Know-About-NTA-and-IDA-Ligands>. [Consultado: 03-Febrero-2016].
- [52] M. M. Bradford, “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, *Anal. Biochem.*, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254, 1976.
- [53] Cultek, “Electroforesis de Proteínas”, *Protoc. y Tec. Soluciones Electroforesis*, no. figura 7, pp. 1–17, 2006.
- [54] R. S. Thies, T. Chen, M. V Davies, K. N. Tomkinson, A. A. Pearson, Q. A. Shakey y N. M. Wolfman, “GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding,” *Growth Factors*, vol. 18, no. 4, pp. 251–259, 2001.
- [55] M. S. Jiang, L. F. Liang, S. Wang, T. Ratovitski, J. Holmstrom, C. Barker y R. Stotish, “Characterization and identification of the inhibitory domain of GDF-8 propeptide”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 315, no. 3, pp. 525–531, 2004.
- [56] J. Zhu, “Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production,”

Biotechnol. Adv., vol. 30, no. 5, pp. 1158–1170, 2012.

- [57] V. Picanço-castro, M. Cristina, C. De Freitas, A. D. S. Bomfim, E. Maria y D. S. Russo, “Patents in Therapeutic Recombinant Protein Production Using Mammalian Cells”, *Recent Patents on Biotechnology*, vol. 8, pp. 165–171, 2014.
- [58] A. D. Bandaranayake y S. C. Almo, “Recent advances in mammalian protein production”, *FEBS Lett.*, vol. 588, no. 2, pp. 253–260, 2014.
- [59] A. C. Dalton y W. A. Barton, “Over-expression of secreted proteins from mammalian cell lines”, *The protein society*, vol. 23, pp. 517–525, 2014.
- [60] S. Naylor, “Biomarkers: current perspectives and future prospects.,” *Expert Rev. Mol. Diagn.*, vol. 3, pp. 525–529, 2003.
- [61] F. Wang, Y. Liao, X. Li, C. Ren, C. Cheng y Y. Ren, “Increased Circulating Myostatin in Patients with Type 2 Diabetes”, *J. Huazhong Univ. Sci. Technol.*, vol. 32, no. 4, pp. 534–539, 2012.
- [62] G. Scharf y J. Heineke, “Finding good biomarkers for sarcopenia”, *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle*, vol. 3, no. 3, pp. 145–148, 2012.
- [63] A. Kalinkovich y G. Livshits, “Sarcopenia: the search for emerging biomarkers”, *Ageing Res. Rev.*, pp. 1–14, 2015.
- [64] H. M. E. Azzazy, M. M. H. Mansour y R. H. Christenson, “Doping in the recombinant era: Strategies and counterstrategies”, *Clinical Biochemistry*, vol. 38, pp. 959–965, 2005.
- [65] A. Thomas, K. Walpurgis, P. Delahaut, M. Kohler, W. Schänzer y M. Thevis, “Detection of small interfering RNA (siRNA) by mass spectrometry procedures in doping controls”, *Drug Testing and Analysis*, 2013.
- [66] M. Minunni, S. Scarano y M. Mascini, “Affinity-based biosensors as promising tools for gene doping detection”, *Trends Biotechnol.*, vol. 26, no. 5, pp. 236–243, 2008.